

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-321279

(43)Date of publication of application : 24.11.2000

---

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

---

(21)Application number : 11-131149

(71)Applicant : MITSUBISHI CHEMICALS CORP

(22)Date of filing : 12.05.1999

(72)Inventor : MUNEBAYASHI TAKAAKI  
IFUKU YASUO

---

### (54) IMMUNOREAGENT AND KIT FOR IMMUNOASSAY

#### (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an immunoreagent whose preservation stability is enhanced and to provide a kit for immunoassay.

SOLUTION: An insoluble carrier particle reagent in which an antigen or an antibody with reference to a substance, to be measured, in a specimen is immobilized to insoluble carrier particles coexists with insoluble carrier particles which have no specificity with reference to the insoluble carrier particle reagent or the substance to be measured. Then, a unit which contains an immunoreagent and a unit which contains one kind or several kinds of buffers constitute this kit.

---

#### LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 19.06.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 07.06.2005

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection] 2005-12757

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection] 06.07.2005

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-321279

(P2000-321279A)

(43) 公開日 平成12年11月24日 (2000. 11. 24)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 33/543	5 8 1	G 0 1 N 33/543	5 8 1 K
			5 8 1 D
	5 0 1		5 0 1 D
			5 0 1 K

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願平11-131149	(71) 出願人	000005968 三菱化学株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目 5 番 2 号
(22) 出願日	平成11年 5 月12日 (1999. 5. 12)	(72) 発明者	宗林 孝明 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 三菱化学株式会社横浜総合研究所内
		(72) 発明者	井福 康夫 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 三菱化学株式会社横浜総合研究所内
		(74) 代理人	100103997 弁理士 長谷川 曉司

(54) 【発明の名称】 免疫試薬及び免疫測定用キット

(57) 【要約】

【課題】 保存安定性の向上した免疫試薬及び免疫測定用キットを提供する。

【解決手段】 不溶性担体粒子に検体中の測定対象物に対する抗原または抗体を固定化した不溶性担体粒子試薬と、該不溶性担体粒子試薬または該測定対象物質に対して特異性を持たない不溶性担体粒子が共存することを特徴とする免疫試薬、並びに該免疫試薬を含むユニットと1種または数種の緩衝液を含むユニットとから構成される免疫測定用キット。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 不溶性担体粒子に検体中の測定対象物に対する抗原または抗体を固定化した不溶性担体粒子試薬と、該不溶性担体粒子試薬または該測定対象物質に対して特異性を持たない不溶性担体粒子が共存することを特徴とする免疫試薬。

【請求項2】 特異性を持たない不溶性担体粒子が、該不溶性担体粒子試薬または該測定対象物質に対して特異性を持たない物質を担体粒子上に固定化したものであることを特徴とする請求項1に記載の免疫試薬。

【請求項3】 特異性を持たない物質が、動物由来の蛋白質、アミノ酸、高分子有機物及び糖類から選ばれることを特徴とする請求項2に記載の免疫試薬。

【請求項4】 不溶性担体粒子試薬の不溶性担体粒子が、不溶性磁性担体粒子または不溶性標識剤含有粒子である請求項1ないし3のいずれかに記載の免疫試薬。

【請求項5】 請求項1ないし4のいずれかに記載の免疫試薬を含むユニット、及び、1種または数種の緩衝液を含むユニットとから構成される免疫測定用キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は免疫試薬、詳しくは、不溶性担体粒子に固定化した抗体もしくは抗原と検体中の抗原もしくは抗体の免疫的結合に伴う粒子凝集反応を利用する免疫測定方法に使用する免疫試薬、並びに該免疫試薬を含む免疫測定用キットに関する。

## 【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】ポリスチレンラテックス等の不溶性担体粒子が免疫反応に伴って凝集する反応を利用した免疫測定方法は、迅速、簡便であると共に、精度の良い測定方法として従来広く利用されている（特公昭58-11575号公報等）。また、不溶性磁性担体粒子を使用する方法（特開平1-193647号公報、特開平3-59459号公報等）や、不溶性磁性担体粒子と蛍光標識粒子を組み合わせた方法（特開昭61-128168号公報、特開平7-72155号公報等）も開発されている。

【0003】これらの免疫測定に使用する免疫試薬を安定に保つためには、一般に冷蔵保存が必要である。しかしながら、通常試薬の使用時には、測定装置内部の熱の影響などで室温ないしそれ以上の温度に曝される。このため、残った試薬を後日使用すると、

- 1) 免疫試薬の容器壁への吸着により試薬濃度が低下し、それに伴って反応性が低下する
- 2) 免疫試薬に分散媒中の不純物が吸着し、反応に干渉する
- 3) 免疫試薬に固定化されている抗原または抗体が脱離する

ということが起こる場合があった。本発明は、これらを抑制し、免疫試薬の保存安定性を向上させるものであ

る。

## 【0004】

【課題を解決する手段】本発明者らは、上記の課題について鋭意検討した結果、従来の免疫試薬において、試薬や試薬の測定対象物に対して特異性を持たない粒子を共存させることにより、上記課題を解決できることを見出し、本発明に到達した。すなわち、本発明の要旨は不溶性担体粒子に検体中の測定対象物に対する抗原または抗体を固定化した不溶性担体粒子試薬と、該不溶性担体粒子試薬または該測定対象物質に対して特異性を持たない不溶性担体粒子が共存することを特徴とする免疫試薬、並びに該免疫試薬を含むユニットと1種または数種の緩衝液を含むユニットとから構成される免疫測定用キットに存する。

## 【0005】

【発明の実施の形態】本発明は免疫試薬中に、不溶性担体粒子試薬並びに「該不溶性担体粒子試薬及び該測定対象物質に対して特異性を持たない不溶性担体粒子」（以下、「ダミー粒子」という。）を共存させることを特徴とし、これにより免疫試薬の保存安定性を向上させるものである。

【0006】本発明の不溶性担体粒子試薬に使用する不溶性担体粒子としては、有機高分子物質、生体由来物質、脂質粒子、金属コロイド粒子及び無機微粉末等を使用することができるが、液体媒体中に分散させたとき、測光するまでは自然の沈降が無く、浮遊しているものが望ましい。有機高分子物質としては、スチレン、ビニルトルエン、メチルメタクリレート、メタクリル酸等を乳化重合して得られる単独重合体もしくは共重合体からなるラテックス等が挙げられる。生体由来物質としては、赤血球などが挙げられる。脂質粒子としては、リボソーム等が挙げられる。金属コロイド粒子としては金コロイド等が挙げられる。無機微粉末としては、セラミック微粒子、シリカ、アルミナ、シリカアルミナ、炭素粉末等が挙げられる。これらの中でも、特にポリスチレンラテックスが有効である。不溶性担体粒子の粒径としては、通常0.01~10 $\mu$ mのものが用いられ、好ましくは0.1~1 $\mu$ mである。

【0007】不溶性担体粒子の種類としては、磁性体含有粒子、標識剤含有粒子、及び非磁性非標識粒子が挙げられ、これらは免疫測定の種類によって選択される。磁性体含有粒子としては、通常上記の不溶性担体粒子中に磁性体として、鉄または磁性酸化鉄等を5~100重量%含有するように調整されたものが用いられる。標識剤含有粒子としては、通常上記の不溶性担体粒子中に標識剤として、酵素、色素、蛍光色素、化学発光性物質または電気化学発光性物質等を含有させたものが挙げられる。尚、標識剤含有粒子としては、不溶性担体粒子を使用せず標識剤に直接抗原または抗体を固定化したものを用いてもよい。この場合には、通常抗原または抗体1分

子あたり標識剤 0.1～100 分子を結合させる。

【0008】本発明の不溶性担体粒子試薬は、一般的に免疫測定に使用されるものであり、上記の不溶性担体粒子に検体中の測定対象物に対する抗原または抗体を固定化したものである。不溶性担体粒子に抗原または抗体を固定化する方法としては、物理的吸着法、または、カルボジイミドなどの縮合剤を用いる等の化学結合法等が用いられる。固定化する抗原または抗体の量は、通常不溶性担体粒子 1mg あたり 50ng～500μg であり、好ましくは 500ng～200μg である。不溶性担体粒子試薬は、免疫測定時に反応液中において、不溶性担体粒子の重量濃度として、通常 0.0001～1%、好ましくは 0.0003～0.3% となるように分散して使用する。

【0009】本発明のダミー粒子は、免疫試薬中の成分と抗原抗体反応を起こさず、かつ、免疫試薬の測定対象物とも抗原抗体反応を起こさない粒子である。このようなダミー粒子としては、免疫測定における不溶性担体粒子試薬として一般的に用いられる不溶性担体粒子であって不溶性担体粒子試薬もしくは測定対象物質に対して特異性を持たないもの、または、この不溶性担体粒子に不溶性担体粒子試薬もしくは測定対象物質に対して特異性を持たない物質を固定化したものを使用することができ

る。

【0010】本発明のダミー粒子またはその担体粒子としては、免疫測定における不溶性担体粒子試薬として一般的に用いられる不溶性担体粒子であれば特に制限無く使用することができるが、非磁性非標識のものを使用することが好ましく、不溶性担体粒子試薬と同じ素材のものを使用することが更に好ましい。また、免疫試薬における干渉反応を防ぐためには、不溶性担体粒子試薬と同じ表面性状のもの、例えば同一合成ロットのものを使用することが特に好ましい。具体的には、不溶性担体粒子試薬に標識剤を結合させる前の原料粒子や、抗原もしくは抗体を固定化させる前の原料粒子などが挙げられる。

【0011】ダミー粒子の粒径は特に制限が無く、免疫測定における不溶性担体粒子試薬として一般的に用いられる不溶性担体粒子の粒径（通常 0.01～10μm）であればよいが、重量当たりの表面積が増える点からは粒径が小さい方が有利である。また、ダミー粒子を反応系から除去しない状態で、濁度ないし透過度の変化により凝集反応を測定する方法を用いる場合には、測定への影響を防ぐために極力小さい粒径のものをを用いることが好ましい。

【0012】ダミー粒子として、不溶性担体粒子に不溶性担体粒子試薬もしくは測定対象物質に対して特異性を持たない物質を固定化したものを使用する場合、担体粒子に固定化する「特異性を持たない物質」としては、

a) 免疫的な特異性の点で、不溶性担体粒子試薬に干渉しないもの b) ダミー粒子自身の安定性（保存安定性、

分散安定性等）を低下させないもの c) 不溶性担体粒子試薬との間に免疫的特異性ではない原因による相互作用を持たないものを使用することができる。「特異性を持たない物質」は、通常動物由来の蛋白質、アミノ酸、高分子有機物及び糖類から選択される。これらの「特異性を持たない物質」の固定化は、ダミー粒子の表面性状を不溶性担体粒子試薬の表面性状に近付ける、または、ダミー粒子の分散安定性を高めるために行われる。

【0013】ダミー粒子は、その表面性状が不溶性担体粒子試薬になるべく近いことが好ましい。通常、不溶性担体粒子試薬は、測定対象物に対する抗原または抗体を固定化する他に、分散安定性を高める目的等から、ウシ血清アルブミン（BSA）、ゼラチン、カゼイン等の生体成分、グリシン、セリン、アラニン等のアミノ酸、糖、PEG 等の親水性高分子有機物等を固定化して用いる。従って、ダミー粒子にも同様の目的でこれらの物質を固定化することが好ましく、不溶性担体粒子試薬と同じ物質を固定化することが実用上特に好ましい。

【0014】また、ダミー粒子を免疫試薬に固定化されている抗原または抗体の脱離を抑制する目的で使用する場合には、不溶性担体粒子試薬に固定化する抗原または抗体と類似の物質で「特異性を持たない物質」をダミー粒子に固定化する。このようなダミー粒子により、不溶性担体粒子試薬上に固定化されている抗原または抗体の、担体粒子と分散媒との脱離／吸着平衡を吸着側にシフトさせることが可能となる。ここで、「不溶性担体粒子試薬に固定化する抗原または抗体と類似の物質」としては、試薬に固定化する抗原または抗体と粒子表面での物性、具体的には、等電点、親水性、疎水性等が類似し、かつ同じ免疫的特異性を持たない物質を使用することができる。例えば、不溶性担体粒子試薬上に測定対象物に対するウサギ由来の抗体が固定化されている場合、ダミー粒子には、免役していないウサギ由来の IgG または測定対象物とは異なる物質に対するウサギ由来の抗体を固定化することが有効である。不溶性担体粒子試薬上に抗原が固定化されている場合には、その抗原に等電点、親水性、疎水性等が類似する物質を固定化することが有効である。

【0015】本発明のダミー粒子の担体にこれらの特異性を持たない物質を固定化する方法としては、物理的吸着法、または、カルボジイミドなどの縮合剤を用いる等の化学結合法等が用いられる。固定化する特異性を持たない物質の量は、通常担体粒子 1mg あたり 50ng～500μg であり、好ましくは 500ng～200μg である。本発明のダミー粒子の配合濃度は、不溶性担体粒子試薬に対して、通常 0.1～300 重量%、好ましくは 1～100 重量% である。

【0016】本発明の免疫試薬は、不溶性担体粒子試薬とダミー粒子の他、通常は分散媒を含む。分散媒としては、通常、緩衝液、生体由来成分、塩類、界面活性剤及

びこれらの組み合わせを含む水が用いられる。緩衝液を使用する場合には、通常水に対して1～500mM使用する。また、通常pH5～10、好ましくはpH6～9となるように調整する。緩衝液としては、トリスヒドロキシメチルアミノメタン、リン酸などが挙げられる。生体由来成分を使用する場合、通常水に対して0.01重量%～10重量%含有させる。生体由来成分としては、牛血清アルブミン、ゼラチンなどが挙げられる。塩類を使用する場合、通常水に対して0.1～10重量%含有させる。塩類としては、塩化ナトリウムなどが挙げられる。界面活性剤を使用する場合、通常水に対して0.0001～1%含有させる。界面活性剤としては、ノニオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、両性界面活性剤、及びこれらの組み合わせが挙げられる。本発明の免疫試薬は、通常不溶性担体粒子試薬とダミー粒子とを適当な手段で分散媒に分散させ、必要な場合には更に凍結乾燥することにより製造される。

【0017】本発明の免疫試薬を用いる免疫測定には、通常反応緩衝液を使用する。反応緩衝液としては、通常水にトリスヒドロキシメチルアミノメタン、リン酸、酢酸ナトリウム、グリシン、ホウ酸など1～500mMを添加し、pH1～10に調整した緩衝液に、塩化ナトリウムなどの無機塩類を0.5～20重量%、牛血清アルブミン、正常ウサギ血清などの生体成分を0.1～10重量%及び界面活性剤を0.0003～1重量%含むものを使用する。反応系により、反応緩衝液は1種類または2種類以上使用される。緩衝液が1種類の場合、pHは6～9の中性付近を用いることが多いが、2種類以上使う時は、初めがpH2、後から別の緩衝液を加えて、最終的には中性付近とすることもある。塩濃度、蛋白濃度なども、反応系によりかなり異なるため、使用する幅は広い。

【0018】本発明の免疫試薬は、以下の免疫測定方法において好適に使用される。

(1) 反応容器に検体、反応緩衝液、及び、不溶性担体粒子に抗体もしくは抗原を固定化した免疫試薬を分注後、攪拌し、抗原抗体反応による粒子の凝集反応を吸光度または散乱光により計測する免疫測定方法、

(2) 検体、反応緩衝液、磁性粒子に抗体または抗原を固定化した第一の免疫試薬、標識された抗体または抗原を含有する第二の免疫試薬を分注、攪拌し、反応後、磁力分離、洗浄を行い、抗原抗体反応により磁性粒子に結合したかまたは結合しなかった標識剤の濃度を計測する

方法。

(3) 第二の免疫試薬が、抗体または抗原に標識剤を直接結合したものであるかまたは、標識剤を含有した不溶性粒子である上記方法。

(4) 第一の免疫試薬による第一反応と第二の免疫試薬による第二反応の間に分離洗浄工程が入る上記免疫測定法。

(5) 標識剤の検出法が、吸光度、蛍光、化学発光、電気化学発光である上記免疫測定法。

【0019】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されるものではない。

【0020】実施例1

検体中のB型肝炎表面抗原(HBsAg)を測定する蛍光免疫試薬において、第一の免疫試薬、第二の免疫試薬として下記のものを使用し、各免疫試薬を(1)4℃保管、(2)10℃保管、(3)装置上に毎日8時間セットした後4℃保管という3条件で3週間保管した後、HBsAg濃度が0IU/ml、1IU/mlの標準液の蛍光強度を測定した。免疫測定装置としては、LPIA-A700〔三菱化学株式会社製〕を用いた。測定結果は表1に示した。

【0021】(第一の免疫試薬)

分散媒: 10mM Tris, 0.01% Tween20, pH8.0

不溶性担体粒子試薬: ユウロビウム錯体含有ポリスチレン粒子(粒径0.4μm)〔セラダイン社製〕に抗HBsAg抗体を化学結合法により固定化したものを分散媒に対して0.003重量%

30 ダミー粒子: 0.4μmのポリスチレンラテックスに、正常ウサギ由来の抗体(F(ab')<sub>2</sub>)と牛血清アルブミンを固定化したものを分散媒に対して0.1重量%

【0022】(第二の免疫試薬)

分散媒: 10mM Tris, 0.01% Tween20, pH8.0

不溶性担体粒子試薬: 磁性体を含有したポリスチレン粒子(粒径1μm)〔プロラボ社製〕に抗HBsAg抗体を化学結合法により固定化したものを分散媒に対して0.05重量%

【0023】比較例1

40 第一の免疫試薬として、ダミー粒子を使用しない以外は実施例1と同様にして測定を行った。測定結果は表1に示した。

【0024】

【表1】

	第一免疫試薬	保管条件 (各3週間保管)	蛍光強度 (カウント)	
			HBsAg 濃度 0	HBsAg濃度 1
実施例	試薬+ダミー粒子	4℃	53	447
		10℃	52	440
		装置上にセット	55	451
比較例	試薬のみ	4℃	49	396
		10℃	48	393
		装置上にセット	60	417

【0025】ダミー粒子を含有しなかった比較例では、3週間後に、装置上にセットした試薬が、他の保管条件の試薬に比べて、ブランク値（HBsAg 濃度 0 の蛍光強度）が上昇し、1IU/mlの標準液の値も上昇している。これに対し、ダミー粒子を含有させた試薬では、いずれの保管条件でも差は無く、保存安定性に優れていることがわかる。

20

【0026】

【発明の効果】本発明のダミー粒子を保管時に共存させることにより、免疫試薬の容器壁への吸着による試薬濃度の低下、分散媒中の不純物が吸着による干渉反応、または、免疫試薬に固定化されている抗原または抗体の脱離等を抑制し、免疫試薬の保存安定性を向上させることが可能となる。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**